

龙眼 *APETALA1* (*AP1*) 同源基因的克隆与序列分析

高慧颖^{1 3} 李 韬^{1 2} 姜 帆¹ 郑少泉^{1 2*} 陈 亮^{1 4*}

(¹福建省果树(龙眼、枇杷)育种工程技术研究中心,²福建省农业科学院果树研究所, 福建福州 350013

³河北工程大学农学院, 河北邯郸 057150 ⁴厦门大学生命科学学院, 福建厦门 361005)

摘 要 根据植物 *APETALA1* (*AP1*) 同源基因的高度保守性, 设计合成一对特异引物, 从龙眼基因组 DNA 中扩增出一条长 400bp 左右的基因片段, 插入到 pMD-T 载体中。测序后分析表明, 扩增得到了龙眼 *AP1* 同源基因片段。该片段序列包含两个内含子 (长 96bp 和 165bp), 编码区编码 36 个氨基酸。与其它植物 *AP1* 同源基因的相应区域氨基酸序列具有较高的同源性, 其中与花椰菜 *AP1* 基因同源性高达 91%, 与欧亚种葡萄、苹果、柑橘、枇杷的 *AP1* 基因同源性都在 80% 以上。

关键词 龙眼; 成花基因; 克隆; 序列分析

龙眼 (*Dinocarpus Longan* Lour.) 是无患子科龙眼属植物, 在中国有近千年的栽培历史。生产中存在成花不同步、成花逆转等花期发育调控问题, 严重影响生产的稳定性。龙眼的童期较长, 大多数品种需要在低温条件下才能成花, 而且每年只能开花结果 1 次^[1 2], 这些因素都限制了利用分子生物学技术开展对龙眼成花机理及花期调控的研究。

20 世纪 80 年代以来, 国际上对拟南芥等模式植物开花的分子机制及其遗传控制的研究取得了很大进展, 为木本果树中的同类研究提供了可借鉴的信息和手段^[3]。拟南芥 *APETALA1* (*AP1*) 基因是一个控制花序分生组织特征的基因, 控制其花序分生组织向花分生组织的转变。研究表明, 植物中 *AP1* 基因高度保守^[4]。除了拟南芥, *AP1* 同源基因在花椰菜、金鱼草、烟草、苹果、柑橘等多种植物中被克隆。龙眼成花基因的研究已经取得初步进展, 龙眼 *LFY* 同源基因已经被克隆^[5], 但是龙眼 *AP1* 基因研究还未见报道。

本试验根据 *AP1* 基因保守序列设计合成 PCR 引物, 以栽培品种立冬本的幼叶为试验材料, 对龙眼 *AP1* 同源基因进行克隆和初步分析, 以便为今

后进一步评价和应用该基因奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

立冬本龙眼幼嫩叶片取自福建省农业科学院果树研究所国家果树种质龙眼圃。

1.2 基因组 DNA 的提取

参照王关林等^[6] 基因组 DNA 提取和检测方法进行, 并进行如下修改: 研磨成粉末并迅速装入 5mL 的离心管中, 加入 1ml STE 核分离缓冲液 [700mmol/L NaCl 100mmol/L Tris - HCl (pH8.0), 50mmol/L EDTA (pH8.0), 2%β-巯基乙醇, 2%PVP], 离心 5000rpm、5min、4℃、2 次; 弃去上清液, 加入 65℃预热的 DNA 提取液 3ml 3%CTAB [100mmol Tris - HCl (pH8.0), 20mmol EDTA (pH8.0) 1.4mol/L NaCl 2%β-巯基乙醇]; 抽提时加入等体积的氯仿 异戊醇 无水乙醇 (24/1/16), 重复抽提操作 2 次, 其余操作同文献 [6]。

1.3 引物合成及 PCR 试剂

对多种植物 *APETALA1* (*AP1*) 基因序列的保

收稿日期: 2006-06-12

基金项目: 福建省农业科技重大专项资助项目“闽台果茶良种选育研究及产业化”(2004NE02-1)

* 通讯作者

守区进行分析比对后, 合成了 1 对特异引物 (上海英骏生物公司合成)。

Af 5' - GCAGCAGCTTGATACTACTCTTA - 3'

Ar 5' - GTTTTGCTCCTGTATTGCCTTCT - 3'

10 × Buffer 缓冲液、DL2000 DNA Marker Taq 酶、dNTPs 均购自大连宝生物公司。

1.4 PCR 扩增分析

反应体系为 2.5 μl 10 × PCR Buffer 2.0 μl MgCl₂ 2.0 μl dNTPs 1.0 μl (10 μmol · L⁻¹)、1.0 μl 下游引物 (10 μmol · L⁻¹)、1.0 μl DNA、0.2 μl Taq 酶 (5 U · μl⁻¹)。加灭菌超纯水至总体积 25 μl

反应程序为: 94℃ 变性 5 min 1 个循环; 94℃ 40 s 51℃ 60 s 72℃ 90 s 35 个循环; 72℃ 延伸 5 min; 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 (1.5 h 90 V), 凝胶成像系统 (GDS-8000) 拍照。

1.5 目的片段的回收和重组

把 PCR 扩增得到的目的片段利用胶回收试剂盒 (UNIQ-10 柱式 DNA 试剂盒, 上海生工生物工程) 从琼脂糖凝胶上回收, 连接于 pMD-T 载体 (大连宝生物公司), 16℃ 放置 4 h 转化到 DH5α 大肠杆菌感受态细胞中 (福建农林大学菌物研究中心), 涂布于含有安卡选择培养基的平板上, 震荡培养。24 h 内挑选阳性克隆接种到含安卡的液体培养基中震荡培养。直接吸取阳性克隆培养液 1 μl 作为模板, 按照 (1.4) 中 PCR 程序进行扩增, 电泳后和龙眼基因组 DNA 扩增结果相比较。

1.6 目的片段的测序及分析

把含有目的片段的重组质粒菌液委托上海英骏生物公司进行测序。对测序结果进行初步分析, 推导外显子编码的氨基酸序列, 利用 NCBI 中 Blastp 进行同源性比对。

2 结果与分析

2.1 PCR 产物的扩增和克隆

根据拟南芥、金鱼草、烟草、枇杷等基因所编码的氨基酸序列的保守区设计合成了一对引物, 利用 PCR 技术从龙眼基因组 DNA 中分离 AP1 同源基因片段。结果如图 1 (1、2) 所示, 扩增出一条长度约 400 bp 的 DNA 片段。

该片段与 pMD-T 载体连接, 转化后获得重组质粒。培养后做菌落 PCR 鉴定, 以 1 μl 菌液为模

板, 用合成的一对引物进行 PCR 反应, 得到了与龙眼基因组 DNA 的 PCR 产物大小完全一样的目的片段 (图 1) (3、4、5、6), 说明 PCR 扩增的 DNA 片段已克隆到 pMD-T 载体中。

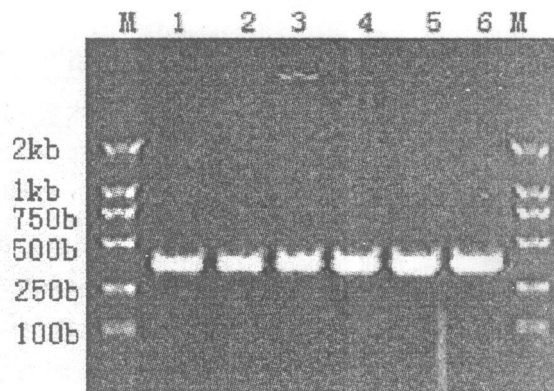


图 1 龙眼 AP1 同源基因片段的 PCR 扩增

(M 为 MarkerDL2000 1 和 2 为基因组 DNA 扩增片段, 3、4、5 和 6 为菌落 PCR 结果)

2.2 目的基因序列分析

目的基因的测序结果如图 2 所示, 该 DNA 片段长 370 bp。利用 BCM Gene Finder 主页 (<http://dot.ingen.bcm.tmc.edu/933I/gene2finder/gf.html>) 上的 SPL (search for potential splice sites) 程序对该序列进行分析^[7], 发现其中含有两个内含子, 长度分别是 96 bp 和 165 bp。外显子共编码 36 个氨基酸。用 Blast 工具搜索 Genbank 进行序列比较, 发现它与已发表的 AP1 同源基因具有很高的同源性, 命名为 LA101。核酸序列已经提交 Genbank 进行登记, LA101 的登记号为 DQ679217。与花椰菜的 AP1-a (CAD47853) 同源性为 94%、欧亚种葡萄 AP1 (AAT07447.1) 同源性为 91%、枇杷 AP1 (AAS55701.1) 同源性为 88%、桦树 MADS5 (CAA67969.1) 同源性为 86%、睡莲 AP1 (AAX13296.1) 同源性为 83%、柑橘 AP1 (AAR01227.1) 同源性为 83%、桃 (AAU29514.1) 同源性为 80%。

3 讨论

龙眼幼嫩叶片中含有大量的酚类和多糖物质, 是提取高质量基因组 DNA 的主要障碍^[5]。试验表明, STE 抽提后可除掉叶片组织中大量的原花色素类等物质, 防止它们在氧化后与 DNA 结合。同时

Tris-盐酸与酚类化合物形成复合物, 抑制酚类化合物的氧化及其与 DNA 的结合, 有效地解决了龙

眼 DNA 提取纯度低和产量少的问题。

```

1gCAGCAGCTTGATACTACTCTTAAGCACATTAGATCCAGAAAGGTATTATGGACTATTATTGTTGTCTTATCCTGATAATAA
   Q   Q   L   D   T   T   L   K   H   I   R   S   R   K
83CCCCGTTTATAAGATTTTTTTTGTAGTTAGATAATACTGAATTTATATTTCTTTGCAGAAACCAACTGATGTATG
                                     N   Q   L   M   Y
156ATTCCATCTCTTAGCTTCAAAGAAAGGTGAGCAGGACCTTTTAGCATGTTTACAAATTAGTTCAATA
   D   S   I   S   E   L   Q   R   K
223AAAACCTGAACATTGGCGAATAATAATACATAGATAAAGTAAATATTTGATGCATGGATATATTTCTTAAAT
295ATTAGGTAGAAATTCTAGAATGAGAATCTAAGTTGGTTCTGTTGTCTGACAGGAGAAGGCAATACAGCAGC
                                     E   K   A   I   Q   E   Q
366AAAAC
   N
    
```

图 2 龙眼 *AP1* 同源基因片段核苷酸序列及推导的氨基酸序列

利用目的基因的保守序列设计引物, 通过 PCR 技术在其它物种中得到同源基因, 被证明是功能基因克隆的有效策略之一。自拟南芥 *AP1* 基因被克隆以后, *AP1* 同源基因已经在玉米、枇杷^[8]等多种植物中得到分离。本试验成功克隆出龙眼 *LA101* 同源基因, 进一步证实了 *AP1* 基因具有高度的保守性。

AP1 基因不仅调控花分生组织的形成与花器官的发生, 还是两轮花器官 (花萼和花瓣) 的决定基因。一旦突变将导致萼片转变为叶片状结构, 此叶片状结构腋部又产生次生花。*AP1* 基因和 *AP2* 基因的共同作用使萼片花瓣特异化, 受 *TFL2* 等基因的负向调节。此外, *AP1* 蛋白以序列特异方式与 DNA 结合, 具有转录调节因子功能^[9-10]。*AP1* 基因成功地在柑橘中得到表达, 使转基因柑橘在转移到温室后 13 个月便可以开花^[11]。同时 *AP1* 基因也在矮牵牛^[12]中得到表达, 转化后和对照组培苗比较能持续不断地开花。但是矮牵牛的雄花出现败育现象, 具体原因还有待于研究。

本试验成功克隆到龙眼成花同源基因的片段, 还需克隆 *AP1* 基因的全长序列和进一步的功能验证, 这些将是今后研究的方向。阐明龙眼开花的分子机制及其遗传控制, 还可为今后的杂交育种提供理论指导。

致谢 福建农林大学菌物研究中心谢宝贵教

授、饶永宾同学提供了感受态大肠杆菌, 并在试验中给予大力支持。在此表示感谢。

参考文献

- [1] 林顺权, 等. 龙眼的成花逆转与“冲梢”调控. 植物生理学通讯, 2001, 37 (6): 581-583
- [2] 赖钟雄, 等. 龙眼的遗传学研究. 福建农业大学学报, 2000, 29 (4): 416-420
- [3] 傅永福, 等. 植物成花转变过程的基因调控. 植物生理学通讯, 1997, 33 (5): 393-400
- [4] 杨传平, 等. 高等植物成花基因的研究. 遗传 HEREDITAS, 2002, 24 (3): 379-384
- [5] 郑丽霞, 等. 龙眼 *FLO/ALFY* 同源基因 cDNA 片段的克隆. 中山大学学报: 自然科学版, 2004, 43 (增刊): 60-64
- [6] 王关林, 等. 植物基因工程. 北京: 科学出版社, 2002, 744
- [7] 陈大明, 等. 柑桔 *LEAFY* 同源基因片段分离及特性研究. 园艺学报, 2001, 28 (4): 295-300
- [8] 刘月学, 等. 普通枇杷和桫叶枇杷 *APETALA1* 同源基因的克隆和序列分析. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2006, 35 (2): 173-176
- [9] 刘春玲, 等. 成花基因研究进展. 果树学报, 2001, 18 (6): 352-357
- [10] Flanagan CA et al. Spatially and temporally regulated expression of the MADS-box gene *AGL2* in wild type and mutant Arabidopsis flowers. Plant Mol Biol, 1994, 26: 581-596
- [11] Pena L et al. Constitutive expression of Arabidopsis *LEAFY* or *APETALA1* genes in citrus reduces their generation time. Nature Biotechnology, 2001, 19 (5): 263-267
- [12] 安利忻, 等. 花分生组织决定基因 *AP1* 转化矮牵牛的研究. 植物学报, 2001, 43 (1): 63-66